

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-72893

(43)公開日 平成 6 年(1994) 3 月15日

| | | | | |
|--------------------------|-------|---------|-----|--------|
| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| A 6 1 K 37/20 | A B G | 8314-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 22 頁)

| | | | |
|----------|---------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願平4-203558 | (71)出願人 | 000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町 2 丁目 1 番 5 号 |
| (22)出願日 | 平成 4 年(1992) 7 月30日 | (72)発明者 | 青木 重久 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21 愛知 医科大学医学部内 |
| | | (72)発明者 | 岩崎 慎一 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21 愛知 医科大学医学部内 |
| | | (72)発明者 | 杉浦 信夫 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21 愛知 医科大学分子医科学研究所内 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 津国 肇 (外 1 名) 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 抗リウマチ剤

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 抗リウマチ剤を提供する。

【構成】 脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする。脂質がホスファチジルエタノールアミンであり、グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸である、脂質結合グリコサミノグリカン。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする抗リウマチ剤。

【請求項2】 脂質がホスファチジルエタノールアミンであり、グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸である請求項1記載の抗リウマチ剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、脂質結合グリコサミノグリカンを含む有効成分とする抗リウマチ剤に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性関節リウマチ（以下、RAという）は、関節炎を主病変とする慢性多発性炎症疾患であり、その血清及び関節液には、免疫グロブリンIgGと反応する自己抗体であるリウマトイド因子（以下、RFという）が検出される。RFの存在から、その病態には免疫異常が関与していると考えられているが、その病因は未だ不明である。RAの病態変化としては、便宜的におおよそ3期に分けて考えられている（Zvaifler NJ., Adv. Immunol., 16, 265-336, (1973)）。第1期は、未知の病原因子、すなわち抗原が関節滑膜に到達して滑膜炎が開始される初期相である。第2期では、滑膜炎を引き金として慢性炎症が大きく展開する。すなわち、滑膜表層下の微小血管新生、滑膜下組織の浮腫、滑膜表層細胞の増殖、肥厚および多層化などが現れ、小血管周囲ではリンパ濾胞様のリンパ球浸潤とその周辺の形質細胞浸潤がみられる。そして第3期では、炎症滑膜が細長い絨毛突起（パンヌス）となって関節腔内に突出し、軟骨破壊・骨破壊、そしてついに関節強直へと進行していく。この第3期の軟骨破壊・骨破壊は、臨床上著しい機能障害を残し、リウマチ患者の日常生活を著しく障害するので、初期の滑膜炎の防止と共に最も重要な時期である。軟骨破壊には、リウマチ関節液中に多量に放出されているプロテアーゼなどの消化酵素による、関節表面からのプロテオグリカンの直接分解作用と、滑膜組織のパンヌスによりその関節軟骨との接合部での細胞組織の破壊の機序があり、リウマチ患者の軟骨表層部ではプロテオグリカンの減少が見られる。リウマチ患者では、特異的にフィブロネクチン様物質を含んだ免疫複合体の関節軟骨表層への被覆がおこり、これが更にパンヌスを進行させているといわれている。特にフィブロネクチンは、活動性のリウマチ滑膜できわめて多量に産生されており、これは間葉系細胞の伸展因子であることから、パンヌスの伸展に積極的に関与していると考えられている（Shiozawa S., Scand. J. Rheu., Suppl. 74, 56-72, 1988）。

【0003】上述のようにRAの原因は現在なお不明であり、その確実な治療法も未だ確立されていない。特にパンヌスの伸展抑制に効果のある薬剤は皆無である。また現在治療に使われている薬剤は、その効果が不十分であることはもとより、それらによる重篤な副作用が併発

する問題もある。したがって、前記RAの諸症状を改善する薬剤の開発が望まれている。

【0004】動物モデルとして、大腸菌O:14株加熱死菌で感作誘導したウサギの関節炎は、極めてリウマチに類似した症状を呈する点が特徴的である（Aoki S., et al., Arthritis and Rheumatism, 28, 522-528, 1985, およびAoki, S., 中部リウマチ（Chubu Rheum. Assoc.）, 21, 1-13, 1990）。すなわち、滑膜表層細胞の多層化、表層細胞下の浮腫、リンパ濾胞を伴う小円形浸潤、フィブリノイド沈着およびパンヌス形成などの関節病理所見に加え、血清中にIgGと反応する自己抗体、RF様物質が検出される点で、RAの動物モデルとして優れている。

【0005】なお、関節炎を早期に時期をそろえて確実に発生させるために、大腸菌O:14株加熱死菌を数ヶ月感作後、膝関節腔内に直接大腸菌死菌を投与して関節炎を起こさせる抗原誘導関節炎でも、同様なRA様の症状を呈する。

【0006】一方本発明者らは、先にグリコサミノグリカンと脂質とが共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンを合成し、細胞接着阻害作用及び癌転移抑制作用を有することを見い出している（特開平4-80201号、特開平4-80202号、特開平4-82836号、生化学, 62(7), 880, 1990、生化学, 63(8), 948, 1991）。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述の通り、優れた治療効果を有し、毒性等の副作用のない抗リウマチ剤が求められていた。

【0008】本発明の目的は、上記RAの諸症状を改善するための抗リウマチ剤として新しい物質を提供することである。特に、軟骨破壊を引き起こすパンヌスの伸展を抑制する効果を有し、滑膜の炎症反応をやわらげる効果を有するとともに、毒性および副作用のない抗リウマチ剤を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする抗リウマチ剤である。

【0010】上記脂質結合グリコサミノグリカンはグリコサミノグリカンと脂質とが共有結合した構造のものであればよいが、好ましい構造は、グリコサミノグリカン（以下、GAGという）の還元末端のピラノース環を特異的に開環させ、化学的処理により形成されたカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基もしくは1級アミノ基と、脂質の官能基が共有結合した構造である。

【0011】該脂質結合GAGの特好ましい態様は、GAGを還元反応及び限定酸化反応（部分酸化反応）に付すことにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環させるとともに、GAGの還元末端にホルミル基を形

3

成させ、次いで該ホルミル基と脂質の1級アミノ基とでシッフ塩基を形成させ、次いで該シッフ塩基を還元することによって得られる脂質結合GAG、あるいはGAGを酸化反応に付すことにより還元末端のピラノース環を特異的に開環させるとともに、GAGの還元末端にカルボキシル基を形成させ、次いでラクトン形成反応に付すことによってGAGの還元末端をラクトン構造とし、次いで該ラクトンと脂質の1級アミノ基とを反応させることによって得られる脂質結合GAGである。

【0012】以下、本発明をより詳細に説明する。本発明の抗リウマチ剤の有効成分である脂質結合GAGは公知物質である。例えば特開平4-80201号公報又は特開平4-80202号に記載された化合物が例示されるが、本発明はこれに限定されず、GAGと脂質とが共有結合した脂質結合GAGであれば本発明薬剤の有効成分として使用できる。

【0013】特に脂質結合GAGは、GAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基、水酸基もしくは1級アミノ基、又はGAGに別途導入された前記基と、脂質のカルボキシル基、ホルミル基もしくは1級アミノ基、又は脂質に別途導入された前記基との間で形成される酸アミド結合（-CONH-）、エステル結合又はアミノアルキル結合（-CH₂NH-）によって共有結合したものが好ましい。とりわけ、以下の①～③の結合によって得られたものが好ましい。

4

【0014】なお、上記結合に関与するアミノ基、カルボキシル基、ホルミル基、水酸基は、GAG又は脂質に元来存在するもの、これらに化学的処理を施すことによって形成されたもの、あるいは上記官能基を末端に有するスペーサー化合物を、予めGAG又は脂質と反応させることによって別途導入されたもののいずれであってもよい。

【0015】① GAGの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたGAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（-CONH-）、

② GAGのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（-CONH-）、又は

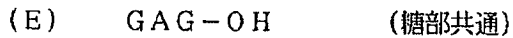
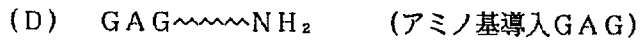
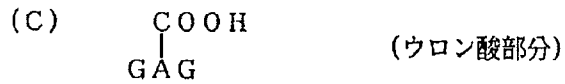
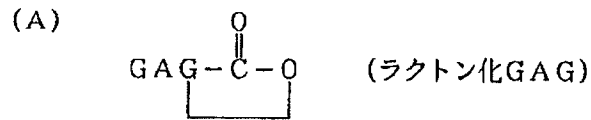
③ GAGの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたGAGのホルミル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成されたシッフ塩基を還元して形成されたアミノアルキル結合（-CH₂NH-）。

脂質結合GAGとその原料化合物との関係を模式的に示すと次の通りである。

【0016】

【化1】

(1) GAG⁵またはその誘導体

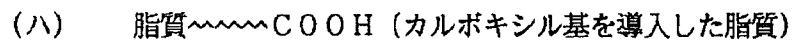


上式中、GAGはグリコサミノグリカン、 $\sim\sim\sim\text{NH}_2$ は導入されたアミノ基を示す。

【0017】

* * 【化2】

(2) 脂質またはその誘導体



上式中、 $\sim\sim\sim\text{COOH}$ は導入されたカルボキシル基を示す。

【0018】

【化3】

7

(3) 脂質結合GAG

- (a) (A) + (イ) \longrightarrow GAG-CONH-脂質
- (b) (A) + (ロ) \longrightarrow GAG-CONH~~~~脂質
- (c) (B) + (イ) \longrightarrow GAG-CH₂NH-脂質
- (d) (B) + (ロ) \longrightarrow GAG-CH₂NH~~~~脂質
- (e) (C) + (イ) \longrightarrow CONH-脂質
 $\quad \quad \quad |$
 $\quad \quad \quad$ GAG
- (f) (C) + (ロ) \longrightarrow CONH~~~~脂質
 $\quad \quad \quad |$
 $\quad \quad \quad$ GAG
- (g) (D) + (ハ) \longrightarrow GAG~~~~HNCO~~~~脂質
- (h) (D) + (ニ) \longrightarrow GAG~~~~HNCH₂-脂質
- (i) (E) + (ハ) \longrightarrow GAG-O-CO~~~~脂質

【0019】本発明で用いる脂質結合GAGは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミンのようなアミン塩；ピリジンのような有機塩基との塩であることができる。

【0020】原料のGAGは、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的もしくは酵素的に合成されたものなどのいずれも使用することができ、具体的にはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（A, C, D, E, K）、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸等が例示される。これらのGAGは通常使用される塩（例えばナトリウム塩）であってもよい。

【0021】原料の脂質は、動物、植物、微生物等の天然物由来又は化学的もしくは酵素的に合成もしくは部分的に分解された複合脂質又は単純脂質を使用することができ、特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジトレオニン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルイノシトール等のリン脂質；モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の中性脂質等のグリセロ脂質が好ましい。とりわけ、1級アミノ基を有するリン脂質が好ましい。なお、脂質中のアシル基の鎖長及び不飽和度は特に限定されないが、例えばパルミトイル（ヘキサデカノイル）又はステアロイル（オクタデカノイル）が例示される。ま

た、これら脂質は通常使用される塩であってもよい。

【0022】有効成分である脂質結合GAGの製造法は特に限定されず、公知の合成法（例えば、特開平4-80201号、特開平4-80202号参照）を採用することができる。代表的な合成法について以下に説明する。

【0023】還元末端限定酸化法

この方法は、GAGの還元末端の糖残基であるキシロース残基、ガラクトース残基、ウロン酸残基又はヘキサミン残基を還元し、限定酸化（部分酸化）することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環（開裂）させるとともに、該GAGの還元末端にホルミル基を形成させてアルデヒド化合物とし、このアルデヒド化合物のホルミル基と脂質の1級アミノ基とを反応させてシッフ塩基を形成させ、次いでシッフ塩基を還元し、アミノアルキル結合（-CH₂NH-）を形成させて、GAGと脂質とを共有結合させる方法である。

【0024】GAGの還元末端の糖残基の還元は、GAGに対して5～50当量程度、好ましくは25～30当量の還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、ホウ酸塩緩衝液等）中、通常10～30℃、好ましくは15～25℃で行うことができる。

【0025】上記還元後、限定酸化を行ってGAGの還元末端に特異的にホルミル基を有するアルデヒド化合物を合成する。該酸化反応は、上記還元後のGAGに対して1～10当量、好ましくは3～6当量の酸化剤（過ヨ

ウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム等の過ヨウ素酸アルカリ塩など)を用い、通常0~10℃、好ましくは0~4℃で行うことができる。

【0026】得られたアルデヒド化合物と1級アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質など)とを反応させてシッフ塩基を形成させる反応は、水性溶媒(水、リン酸塩緩衝液等)又は適当な有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に、上記アルデヒド化合物を溶解した溶液と適当な有機溶媒(クロロホルム、メタノール等)に脂質を溶解した溶液とを混合し、通常15~60℃の温度で反応させることができる。この反応時又は反応終了後に適当な還元剤(水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など)を作用させてシッフ塩基を還元することができる。

【0027】なお、本反応方法で脂質結合GAGを製造する際に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2官能性のスペーサー化合物(例えば、エチレンジアミン等のアルキレンジアミン;リジン等のアミノ酸)と上記アルデヒド化合物とを反応させて、アミノアルキル結合(-CH₂NH-)を形成させ、次いで上記スペーサー化合物の他方の官能基(例えば、アミノ基)と反応し得る官能基(例えば、カルボキシル基)を有する脂質(例えば、モノアシルグリセロールコハク酸エステル等のモノアシルグリセロールジカルボン酸エステル)と反応させてもよい。

【0028】還元末端ラクトン化法

この方法は、GAGの還元末端の糖残基であるキシロース残基、ガラクトース残基、ウロン酸残基又はヘキサミン残基を酸化することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環(開裂)させて該GAGの還元末端にカルボキシル基を形成させて、次いでラクトン形成反応に付すことによって該GAGの還元末端をラクトン構造とし、このラクトンと脂質の1級アミノ基とを反応させて酸アミド結合(-CONH-)を形成させることによって、GAGと脂質とを共有結合させる方法である。

【0029】GAGの還元末端の糖残基の酸化は、GAGに対して2~20当量程度、好ましくは5~15当量の酸化剤(ヨウ素、臭素等)を使用し、適当な水性溶媒(例えば、水、リン酸塩緩衝液等)中、通常0~40℃、好ましくは15~20℃で行うことができる。

【0030】上記酸化反応後、強酸性陽イオン交換樹脂(例えば、ダウエックス50(商品名;ダウ・ケミカル社製)、アンバーライトIR-120(商品名;オルガノ(株)製)及び/又は酸(塩酸、硫酸等の無機酸;酢

酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸の酸無水物)で処理することによって、GAGの還元末端が特異的にラクトン化されたラクトン化合物を合成することができる。

【0031】得られたラクトン化合物と1級アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質)との反応は、適当な水性溶媒(水、リン酸塩緩衝液等)又は適当な有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)にラクトン化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒(クロロホルム、メタノール等)に脂質を溶解した溶液とを混合し、5~80℃、好ましくは30~60℃の温度で反応させればよい。

【0032】なお、還元末端限定酸化法の場合と同様に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2官能性のスペーサー化合物と上記ラクトン化合物とを反応させて酸アミド結合(-CONH-)を形成させ、スペーサー化合物の他方の官能基と脂質の官能基(例えばカルボキシル基)とを反応させてもよい。

【0033】その他の方法

上記以外の方法としては、例えばGAGのウロン酸部分のカルボキシル基と脂質の1級アミノ基とを反応させて、酸アミド結合(-CONH-)を形成させる方法が挙げられる。

【0034】上記反応に際し、縮合剤[例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等]を用いて酸アミド結合(-CONH-)を形成させるか、あるいはウロン酸部分のカルボキシル基を、上記縮合剤の存在下、活性化剤(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール等)と反応させて活性エステルとした後、脂質と反応させて酸アミド結合(-CONH-)を形成させることができる。

【0035】なお、上記反応において、GAGのウロン酸部分を有機溶媒に溶解可能な塩(トリエチルアミン、トリブチルアミン等のアミンの塩等)とし、反応を有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン等)中で行うことが好ましい。

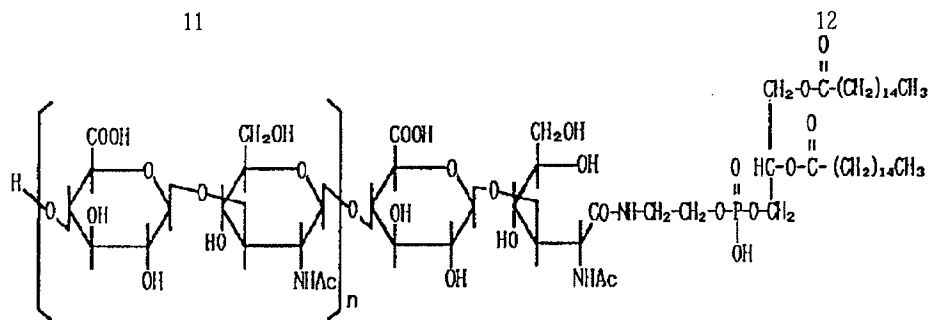
【0036】代表的化合物

本発明の有効成分である脂質結合GAGの好適な化合物を以下に例示する。

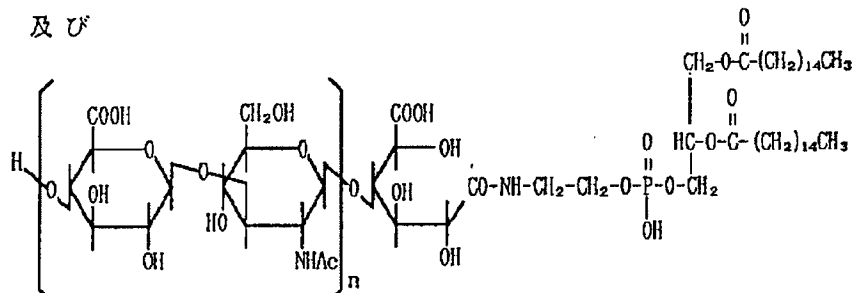
(1) ジパルミトイル-L-(α-ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸

【0037】

【化4】



及び



n : 平均 25

【0038】原料

GAG: ヒアルロン酸 (鶏冠由来、分子量 1万)

脂質: ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン

合成法

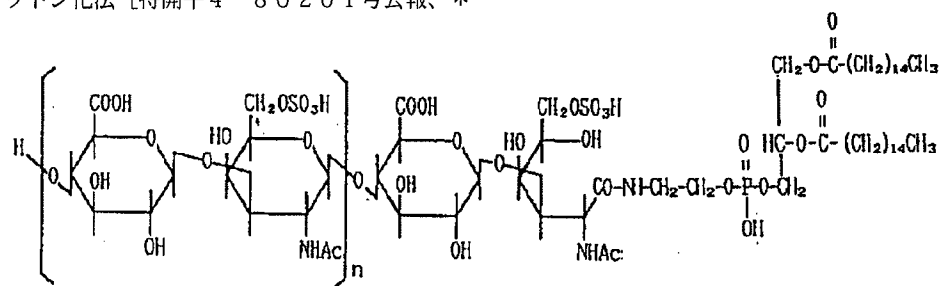
還元末端ラクトン化法 [特開平4-80201号公報、*

* 実施例1-(2)-1) 参照]

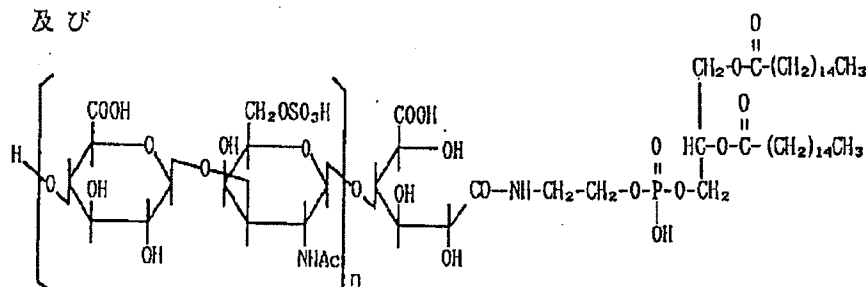
【0039】(2) ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸

【0040】

【化5】



及び



n : 平均 60

【0041】原料

GAG: コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来、分子量 3万)

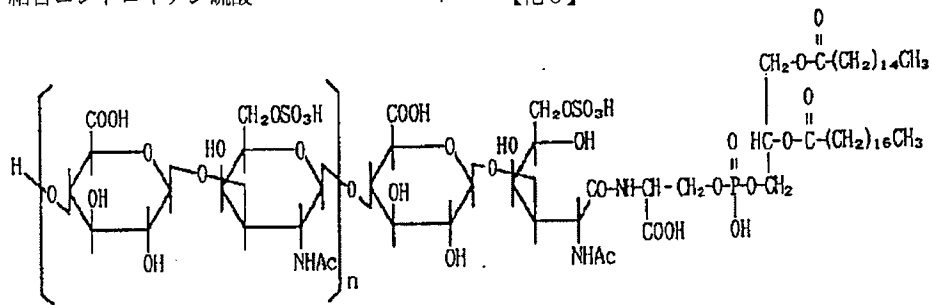
脂質: ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エ

タノールアミン

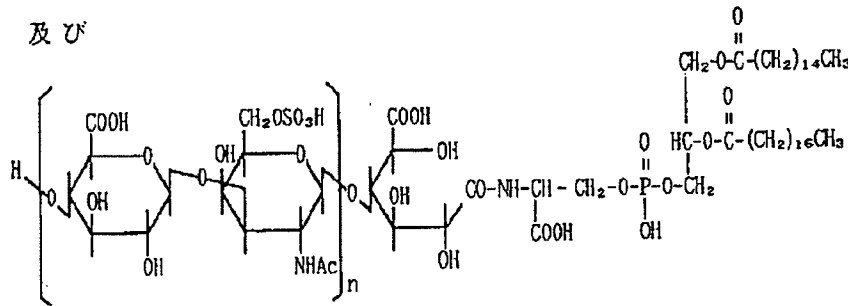
合成法

還元末端ラクトン化法 [特開平4-80201号公報、実施例1-(2)-2) 参照]

【0042】(3) ステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン結合コンドロイチン硫酸 * 【0043】
* 【化6】



及び



n : 平均60

【0044】原料

GAG: コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来、分子量 3万)

脂質: ステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン

合成法

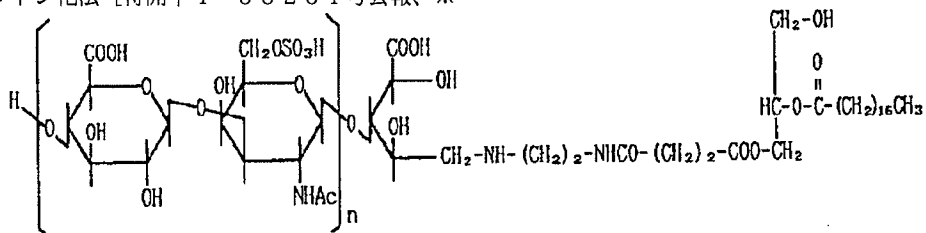
還元末端ラクトン化法 [特開平4-80201号公報、※

※実施例1-(3) 参照]

【0045】(4) モノステアロイルグリセロール・コハク酸エステル結合コンドロイチン硫酸

【0046】

【化7】



n : 平均60

【0047】原料

GAG: コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来、分子量 3万)

脂質: モノステアロイルグリセロール・コハク酸エステル

合成法

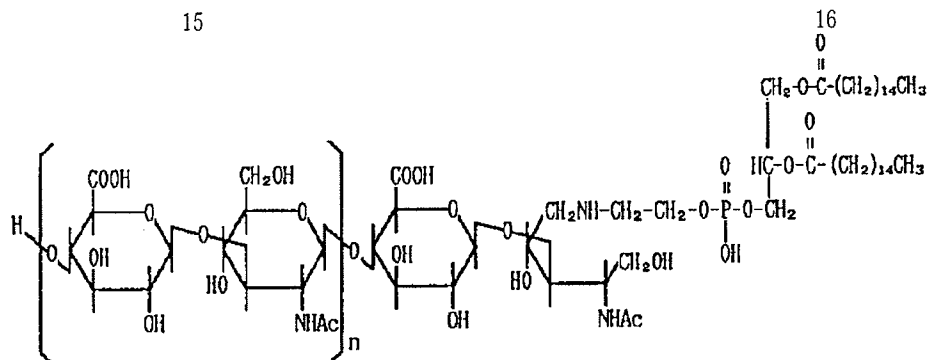
還元末端限定酸化 (アルデヒド化) GAG にエチレンジ

アミンを反応させた後、上記脂質と反応させる (還元末端アミン法) [特開平4-80201号公報、実施例2-(3) 参照]

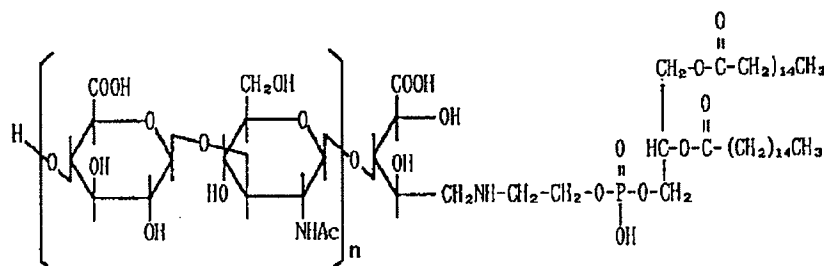
【0048】(5) ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン結合ヒアルロン酸

【0049】

【化8】



及び



n : 平均 2.4

【0050】原料

GAG: ヒアルロン酸 (鶏冠由来、分子量 1万)

脂質: ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン

合成法

還元末端限定酸化法 [特開平4-80202号公報、実施例1-(2)-1) 参照]

【0051】抗リウマチ剤

本発明の抗リウマチ剤は、血清及び関節液にRFが検出される慢性多発性炎症疾患、特にRAを治療又は予防するためのヒトを含む哺乳動物の医薬品として使用される。すなわち、本発明の抗リウマチ剤は、脂質結合GAGを経口的あるいは非経口的投与 (静脈内、筋肉内、関節内、皮下など組織内投与 (注射)、経腸投与、経皮投与等) のための医薬品として、液体製剤、固体製剤、半固体製剤など任意の剤形に製剤化したもので、任意の投与ルートで患者に投与される。該製剤は、脂質結合GAGに通常薬学的に許容される製剤補助剤を加えることにより常法に従って製造される。さらに公知の技術により持続性製剤とすることも可能である。

【0052】脂質結合GAGは、多くは水溶性であり、容易に液体製剤を調製することができる。特に、抗リウマチ剤としての効果を十分に発揮させるために、注射剤として関節腔内に投与することが好ましい。注射剤等の液体製剤を製造するには、脂質結合GAGを必要に応じてpH調整剤 (塩酸、水酸化ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなど)、等張化剤 (塩化ナトリウム、ブドウ糖な

ど) とともに注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンフルに充填するか、さらにマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチンなどを加えて真空下に凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤としてもよい。また、脂質結合GAGに、乳化剤 (レシチン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油など) を加えて水中で乳化させ、注射用乳剤とすることもできる。

【0053】また、脂質結合GAGと賦形剤 (乳糖、デンプン、結晶セルロースなど)、結合剤 (白糖、ヒドロキシプロピルセルロースなど)、崩壊剤 (カルボキシメチルセルロースなど)、滑沢剤 (ステアリン酸マグネシウム、タルクなど) などの製剤補助剤を用いて、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤等の経口投与用の固形製剤、あるいは脂質結合GAGに甘味剤 (白糖、ソルビトールなど)、水、精油、エタノールなどを加えてシロップ剤などの経口投与用の液状製剤とすることもできる。

【0054】さらに脂質結合GAGを、白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィンなどに加えて軟膏剤とするか、粘着剤 (ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体など) と練合したのち、ポリエチレンなどの不織布に展延してテープ剤とすることもできる。

【0055】上記製剤中の脂質結合GAGの含有量は、剤形、投与方法、投与回数等によって変動するが、通常、注射剤の場合は0.1~10重量%程度、経口投与用製剤の場合は1~80重量%程度、外用剤の場合は0.1~10重量%程度である。

【0056】脂質結合GAGの投与量は、患者の年齢、症状、体重、投与方法によって異なり、一概には特定で

きないが、組織内投与（注射）の場合は1回量1～1000mgを1日もしくは数日に1回投与することが好ましい。特に関節腔内に投与する場合は、各部位の関節腔の大きさに応じて投与量を適宜調節する必要があり、例えば膝関節の場合、成人に対して1回量0.1～10mlの液量で、脂質結合GAGとして0.1～100mg程度を1日～数週間に1回投与することが好ましい。また、経口投与の場合は1日量100～2000mg程度を1回又は数回に分けて投与すればよい。

【0057】本発明の脂質結合GAGは低毒性の化合物であり、医薬としての安全性は極めて高い。脂質結合GAGの急性毒性を以下の方法で調べた。

【0058】4週齢の Sic-ddy 系雌雄マウスを1週間予備飼育後、雄 23～30g、雌20～25gの体重になった時点で、参考例で調製したホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸（CS-PE）又はホスファチジルエタノールアミン結合ヒアルロン酸（HA-PE）を、各々5%の濃度になるように局方生理食塩水に溶解し、腹腔内に投与した。雌雄それぞれ1群10匹を用いて、LD₅₀を算出した。その結果、いずれの化合物もLD₅₀値は2000mg/kg以上であり、医薬としての安全性は問題ない。

【0059】

【実施例】以下に本発明の脂質結合GAGの合成例を示す参考例、薬理作用等の生物学的作用を示す試験例、製剤例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例示には限定されない。

【0060】参考例1：還元末端ラクトン化法によるリン脂質結合GAGの合成

*
表1

*（1）還元末端酸化GAGの合成

ヒアルロン酸（鶏冠由来、分子量 約10,000, HA1）500mgを水10mlに溶解し、0.1M ヨウ素のメタノール溶液5mlを加え、室温で6時間反応させた。その後、反応液に0.1N 水酸化カリウム水溶液約5mlを加えて遊離のヨウ素の色を消失させた。この溶液に酢酸カリウム飽和エタノールを加え、生じた沈澱を濾取し、十分にエタノールで洗浄し、減圧乾燥して還元末端酸化ヒアルロン酸（カリウム塩）423mgを得た。

10 【0061】次いで還元末端酸化ヒアルロン酸400mgを水10mlに溶解し、強酸性陽イオン交換樹脂（Dowex 50(H⁺型））カラム50mlを1時間で通過させ、還元末端ラクトンヒアルロン酸390mgを含む水溶液を得た。

【0062】この水溶液にトリ-n-ブチルアミンを添加して中和し、凍結乾燥して還元末端ラクトンヒアルロン酸トリ-n-ブチルアミン塩400mgを得た。

20 【0063】また、コンドロイチン（鯨軟骨由来のコンドロイチン硫酸を脱硫酸したもの；分子量 約15,000, CH）、コンドロイチン硫酸（鯨軟骨由来；分子量約10,000, CS(S1)；分子量 約30,000, CS(S3)；分子量約60,000, CS(S6)）、デルマタン硫酸（豚皮由来；分子量 約15,000, DS）、ヘパリン（豚小腸由来；分子量 約15,000, Hep）及びヘパラン硫酸（牛腎由来；分子量 約15,000, HS）を、それぞれ原料として使用し、上記の方法に準じて原料GAGに対応する還元末端ラクトン化合物を得た。その結果を表1に示す。

【0064】

【表1】

| GAGの種類 | 原料GAG 使用量(mg) | 還元末端酸化GAG 生成量/ 使用量(mg) | 還元末端ラクトンGAG 生成量(mg) |
|--------|------------------|---------------------------|------------------------|
| CH | 1000 | 823/800 | 780 |
| CS(S1) | 1000 | 901/900 | 805 |
| CS(S3) | 1000 | 895/800 | 850 |
| CS(S6) | 1000 | 913/900 | 887 |
| DS | 100 | 91/ 90 | 96 |
| Hep | 1000 | 902/900 | 946 |
| HS | 100 | 88/ 80 | 72 |

【0065】（2）ジパルミトイル-L-（ α -ホスファチジル）エタノールアミン結合GAGの合成
還元末端ラクトンヒアルロン酸トリ-n-ブチルアミン塩400mgをジメチルホルムアミド200mlに溶解し、

これにジパルミトイル-L-（ α -ホスファチジル）エタノールアミン（以下、PEという）27.6mgを含むクロロホルム溶液を添加し、70℃で2時間反応させた。反応後、クロロホルムを溜去し、過剰量の酢酸ナト

リウムを加え、次いで酢酸ナトリウム飽和エタノールを加え、生成した沈澱を濾取した。これを0.3M 酢酸アンモニウム溶液に溶解し、疎水クロマトカラム(TSK g e l フェニルトヨパール650 M; 東ソー(株)製)400mlに吸着させ、0.3M 塩化アンモニウム水溶液で十分に洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り画分及び洗浄画分に未反応の原料物質が溶出され、30%メタノール水溶液溶出画分に目的物が溶出された。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、透析して脱塩し、凍結乾燥してP E結合ヒアルロン酸(ロット番号:600)36mgを得た。

*ロット番号:600

P E含量:6.44%

ヒアルロン酸含量:82.37%

【0066】ヒアルロン酸以外のG A Gについては、上記(1)で得られた還元末端ラクトン化合物とP Eとを用い、上記の方法に準じて各種のP E結合G A Gを調製した。原料物質の使用量及び目的物質の生成量を表2に、目的物質の分析値を表3にそれぞれ示す。

【0067】

【表2】

*
表2

| G A Gの種類 | 還元末端ラクトンG A G 使用量(mg) | P E 使用量(mg) | P E結合G A G 生成量(mg) |
|-----------|--------------------------|----------------|-----------------------|
| C H | 700 | 32.30 | 70.20 |
| C S (S 1) | 800 | 55.40 | 88.00 |
| C S (S 3) | 400 | 9.26 | 20.00 |
| C S (S 6) | 800 | 9.00 | 56.20 |
| D S | 90 | 4.15 | 4.50 |
| H e p | 800 | 36.91 | 24.00 |
| H S | 70 | 3.31 | 5.74 |

【0068】

※ ※ 【表3】
表3

| G A Gの種類 | ロット番号 | 分析値 | |
|-----------|-------|---------|-----------|
| | | P E (%) | G A G (%) |
| C H | 601 | 4.30 | 90.90 |
| C S (S 1) | 602 | 6.41 | 85.17 |
| C S (S 3) | 602-2 | 2.01 | 89.70 |
| C S (S 6) | 602-3 | 1.08 | 92.00 |
| D S | 604 | 4.00 | 90.66 |
| H e p | 605 | 4.11 | 90.01 |
| H S | 606 | 4.22 | 88.21 |

【0069】参考例2:還元末端限定酸化法による脂質結合G A Gの合成

(1)還元末端酸化G A Gの合成
50 ヒアルロン酸(鶏冠由来, 分子量 約10,000, H

21

A1) 2000mgを0.05M ホウ酸塩緩衝液 (pH8.3) 200mlに溶解し、水素化ホウ素ナトリウム182mgを加えて室温で5時間反応させた。酢酸でpH4.5に調整し、エタノールを加えて生成物を沈澱させ、エタノールで洗浄し、還元末端残基開環ヒアルロン酸1800mgを得た。

【0070】次いで、還元末端残基開環ヒアルロン酸1700mgを40mMイミダゾール緩衝液 (pH6.5) 250mlに溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム139.96mgを加え、0℃で1時間反応させた。反応液にエタノールを加えて生成物を沈澱させ、沈澱をエタノール洗浄し、還元末端限定酸化ヒアルロン酸1600mgを得た。

【0071】また、コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来；分子量 約30,000, CS(S3)) 1000mgと水素化ホウ素ナトリウム31.50mgを使用し、上記と同様の方法によって還元末端残基開環コンドロイチン硫酸897mgを得、次いで還元末端残基開環コンドロイチン硫酸800mgと過ヨウ素酸ナトリウム22.83mgを用い、上記と同様の方法によって還元末端限定酸化コンドロイチン硫酸774mgを得た。

【0072】(2) ジバルミトイル-L- $(\alpha$ -ホスファチジル) エタノールアミン結合GAGの合成
還元末端限定酸化ヒアルロン酸1000mgを0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 100mlに溶解し、これにPE 1mg/mlを含むクロロホルム-メタノール (2:1) 溶液69.2mlを加え、さらにメタノールを加えて均一な溶液とし、50℃で1時間反応させた。次いでシアノ水素化ホウ素ナトリウム25mgを加え、50℃で2時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、5倍量の酢酸飽和エタノールを加え、生じた沈澱を濾取した。沈澱を0.3M 塩化アンモニウム溶液で溶解し、疎水クロマトカラム (TSK gel フェニルトヨパール650 M) 400mlに吸着させ、0.3M 塩化アンモニウム水溶液で十分に洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り画分及び洗浄画分に未反応の原料物質が溶出され、30%メタノール水溶液溶出画分に目的物が溶出された。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、透析して脱塩し、凍結乾燥してPE結合ヒアルロン酸 (ロット番号: 300) 40mgを得た。

ロット番号: 300

PE含量: 6.21%

ヒアルロン酸含量: 62.12%

【0073】また、上記(1)で合成した還元末端限定

22

酸化コンドロイチン硫酸700mg、PE16.15mg及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム5.89mgを使用し、上記と同様の操作でPE結合コンドロイチン硫酸 (ロット番号: 302-2) 29mgを得た。

ロット番号: 302-2

PE含量: 2.22%

コンドロイチン硫酸含量: 65.52%

【0074】試験例1: ウサギ関節軟骨組織及び滑膜組織の同時器官培養におけるパニヌス伸展に対する抑制効果(1)

大腸菌O:14株死菌を静脈注で7~8カ月間感染した白色日本ウサギの膝関節に、大腸菌同株死菌を注射して関節炎を惹起させ、その4~5週後に屠殺・解剖し、膝関節の軟骨組織、及び脂肪組織を含んだ滑膜組織を無菌的に採取し、3~5mm角に切りそろえ、ハanks液で洗浄した。

【0075】10%ウシ胎児血清含有のイスコフ変法培地 (シグマ社) 1mlを満たした6穴の組織培養用プレート (ファルコン(Falcon) 3046、内径35mm; ファルコン社) の中に、フィルター付き培養用プレートインサート (ミリセル(Millicell)-CM、30mm径、ポアサイズ0.4 μ m; ミリポア社) を浸し、そのフィルター上に関節面を上にして上記軟骨組織片を置き、その軟骨片の上に一部重なるように滑膜細胞面を下にして滑膜組織片を置き、37℃で培養した。

【0076】参考例1で合成したPE結合コンドロイチン硫酸 (ロット番号: 602-2; 以下、CS-PEという) を使用し、これをハanks液に溶解して溶液 (100 μ g/ml) とし、該溶液で軟骨組織片を、培養前に、37℃で1時間前処理するか、培地中にCS-PEを100 μ g/mlとなるように添加して培養し、その影響を見た。

【0077】4日ないし8日培養後、器官培養組織片をそのまま中性ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋し、軟骨と滑膜の重なる部分が観察できるように垂直に切断し、得られた切片をヘマトキシリン-エオシン

(以下、HEという) 染色した。顕微鏡で軟骨組織表面に滑膜細胞がパニヌス様に伸展する程度を観察して、非常に強く細胞伸展が起こっているものを++、明らかに伸展がみられるものを+、若干滑膜由来の細胞が軟骨表面にみられるものを±とし、全く細胞伸展がみられないものを-とした。結果を以下の表4に示す。

【0078】

【表4】

表4

| 条件 | パンヌス様滑膜細胞伸展程度 (n=4) | | | |
|-------------------------------------|---------------------|----|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| コントロール (無処理) | ± | ++ | + | ++ |
| 軟骨前処理 (CS-PE 100 $\mu\text{g/ml}$) | ± | ± | - | - |
| 培地中添加 (CS-PE 100 $\mu\text{g/ml}$) | + | ± | ± | ± |

【0079】表4から明らかな様に、CS-PEに軟骨表面への滑膜細胞の伸展（パンヌス）を阻害する効果がみられた。また、培地に添加するよりもあらかじめ軟骨組織に塗布しておいた方（軟骨前処理）が伸展阻害効果は高かった。

【0080】試験例2：ウサギ関節軟骨組織及び滑膜組織の同時器官培養におけるパンヌス伸展に対する抑制効果（2）

大腸菌O：14株死菌を皮下注で4カ月間感作した白色日本ウサギの膝関節に大腸菌同株死菌を注射して関節炎を惹起させ、その5週後に屠殺・解剖し、膝関節の軟骨組織、及び脂肪組織を含んだ滑膜組織を無菌的に採取し、3～5mm角に切りそろえ、ハンクス液で洗浄した。その軟骨組織片の一方を、PE結合コンドロイチン硫酸（CS-PE；ロット番号：602-2）又は参考例1で合成したPE結合ヒアルロン酸（ロット番号：600；以下、HA-PEという）をハンクス液に溶解した*

* 溶液（それぞれ100 $\mu\text{g/ml}$ ）中に移し、37℃で1時間前処理した後、再びハンクス液で洗浄した。

【0081】10%ウシ胎児血清含有のイスコフ変法培地（シグマ社）1mlを満たした6穴の組織培養用プレート（ファルコン(Falcon) 3046、内径35mm；ファルコン社）の中に、フィルター付き培養用プレートインサート（ミリセル(Millicell)-CM、30mm径、ポアサイズ0.4 μm ；ミリポア社）を浸し、そのフィルター上に関節面を上にして上記CS-PE又はHA-PEで前処理した軟骨組織片と未処理軟骨組織片を並べて置き、その軟骨片の間に一部重なるように滑膜細胞面を下にして滑膜組織片を置き、37℃で培養した。

【0082】4日間培養後、試験例1と同様に、器官培養組織片から得られた切片をHE染色し、パンヌス様滑膜細胞伸展程度を判定した。結果を以下の表5に示す。

【0083】

【表5】

表5

| パンヌス様滑膜細胞伸展程度 (n=3) | | | | | |
|---------------------|---|---|------------|---|---|
| 未処理軟骨 | | | CS-PE前処理軟骨 | | |
| 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| + | + | + | - | - | ± |
| 未処理軟骨 | | | HA-PE前処理軟骨 | | |
| 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| + | + | + | ± | + | ± |

【0084】表5から明らかな様に、CS-PE前処理軟骨、すなわちCS-PEを塗布した軟骨表面への滑膜

細胞の伸展（パンヌス）は抑制された。また、HA-PEで前処理した軟骨では、CS-PEほどではないがパ

ンヌスを抑制する効果がみられた。

【0085】参考例1及び2で合成した上記2化合物以外の脂質結合GAGについて、上記と同様にパンヌス様滑膜細胞の伸展阻害効果を調べた。その結果、脂質結合コンドロイチン硫酸（ロット番号：602, 602-3, 302-2）は、いずれも上記CS-PE（ロット番号：602-2）と、ほぼ同等の伸展阻害効果を示した。また、他の脂質結合GAGも、CS-PEよりは劣るが、ある程度の伸展阻害効果を示した。

【0086】試験例3：大腸菌誘導関節炎ウサギに対する脂質結合グリコサミノグリカンの影響

日本白色ウサギ（体重2kg）18羽を用い、大腸菌加熱死菌 1000 μ g の生理食塩水懸濁液 0.5mlに等量のプロインの不完全アジュバンドを混ぜ、その1mlを1カ月ごとに計4回筋肉内に注射した。最終感作後8日目にそれらウサギの両膝関節に大腸菌加熱死菌懸濁液（1000 μ g の抗原液 1ml）を惹起注射した。その左膝関節内に、惹起注射直後から1週間ごとに計5回ないし6回、リン酸緩衝生理食塩水（以下、PBSという）1ml、CS-PE（ロット番号：602-2；1mg/ml）1ml、及び HA-PE（ロット番号：600；1mg/ml）1mlの3種類をそれぞれ6羽ずつに投与した。右膝関節には惹起注射以外はせずに対照とした。

【0087】惹起注射後4週目および6週目の2回に分け、実験動物を解剖し、関節材料を採取した。関節組織はホルマリン固定してパラフィン包埋し、HE染色切片を作成した。関節各部位から得られた組織標本を顕微鏡観察し、パンヌスの伸展や滑膜炎に特に注目して病理学的に関節炎の程度を評価をした。

【0088】全身所見では、対照のPBS投与群に比べ、本発明の薬剤投与群では明らかに動物の活動が活発であり、また対照の右膝関節に比較し、薬剤投与した左膝関節の腫れはほとんど見られず、関節炎症状の改善が観察された。

【0089】組織標本の所見では、PBS投与の対照群は、すべての動物で滑膜が絨毛状に増殖し、滑膜表層部のフィブリン沈着や滑膜表層下組織におけるリンパ濾胞様の小円形細胞浸潤を伴っていた。その滑膜炎組織は、明らかにパンヌスとなって軟骨表面に伸展していた。

【0090】CS-PE投与群では、左右膝関節の同一部位で比較できたものが6例中2例あり、対照の右膝関節にはリンパ濾胞様の小円形細胞浸潤を伴った滑膜絨毛の増生があり、この炎症性肉芽組織はパンヌスとして軟骨表層に向かって伸展しているのが見られた。同一個体同一部位で、CS-PE注射の左膝関節を比較すると、その2例とも関節軟骨へのパンヌスの伸展が抑制されているのが観察された。

【0091】HA-PE投与群では、パンヌス抑制作用はCS-PE投与群ほどははっきりと見られなかったが、滑膜炎部位において対照の右膝関節滑膜に表層部

のフィブリン沈着と表層下のリンパ球の濾胞様集合があり、強い炎症像を呈しているのに対し、HA-PE注射の左膝関節滑膜ではその炎症反応が比較的弱くみられた。このような抗炎症作用は6例中3例に観察された。

【0092】以上の結果から本発明の脂質結合GAGはリウマチ様関節炎症状を改善する効果を有することが明らかである。

【0093】試験例4：脂質結合GAGのウサギ関節軟骨組織内での残存性

正常な日本白ウサギ（体重2.7～3.0kg）と、約6カ月間不完全アジュバンドとともに大腸菌死菌を皮下投与し続けた日本白ウサギの両膝関節に、直接大腸菌死菌を注射して1週間後に関節炎症状を呈した日本白ウサギ（体重2.7～3.0kg）を実験動物として使用した。

【0094】フルオレスアミンで蛍光標識したコンドロイチン硫酸（以下、F-CSという）及び同様に蛍光標識したCS-PE（以下、F-CS-PEという）をPBSにそれぞれ溶解（1mg/ml, 10mg/ml）し、滅菌濾過した。これら被検液を上記の正常ウサギおよび大腸菌感作ウサギの膝関節に、それぞれ1ml/関節ずつ注射した。1mg投与群と、10mg投与群（正常ウサギは10mg投与群のみ）に分け、左膝関節にはF-CSを、右膝関節にはF-CS-PEを投与した。試験物質投与1日後、ウサギを屠殺・解剖し、膝関節組織及びコントロールとして肘関節組織を分離した。採取した関節組織は、脂肪組織を含む滑膜組織、半月板、十字靱帯、骨端軟骨及び関節液である。

【0095】各組織を凍結乾燥した後、プロナーゼ（科研製薬（株））で処理して抽出し、得られた抽出液の蛍光強度から、各組織に付着した蛍光標識誘導体の量を算出した。正常ウサギの結果を図1に、関節炎ウサギの結果を図2に示した。

【0096】正常ウサギでは、関節液中の残存量はF-CS-PEの方が多かったが、有意な差ではなかった。F-CS-PEの関節軟骨への移行量は、F-CSとの間に有意差は認められなかった。しかし、半月板、十字靱帯及び滑膜へのF-CS-PEの移行量はF-CSに比べ有意に多く、特に滑膜組織についてはF-CSの30倍のF-CS-PEが検出された。滑膜組織は脂肪組織を多く含むので、おそらく脂肪組織中にF-CS-PEが蓄積されたものと思われる。

【0097】関節炎ウサギ関節組織の結果は、関節液、関節（骨端）軟骨、半月板、滑膜共に、F-CSに比べF-CS-PEが数倍から約20倍高濃度に取り込まれていた。また、添加容量（1mg, 10mg）に応じて残存量も増加した。正常のウサギとの大きな違いは、関節炎ウサギでは全体に取り込み量が増大しており、特に軟骨組織に対してのF-CS-PEの残存性が、炎症関節組織で大きいことである。この結果は、関節炎軟骨表面にフィブロンectin様物質や免疫複合体が被覆されることと

関連するものと考えられる。

【0098】製剤例：関節注射用液剤

無菌的に調製したCS-PE（ロット番号：602-2）及びHA-PE（ロット番号：600）のそれぞれ45mgを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に室温で溶解して45mlとした。これを無菌濾過（ポアサイズ0.22 μ mのメンブレンフィルター使用）し、2.5mlずつ分注後封入し、1アンプルあたり2.5mgの上記有効成分をそれぞれ含有する関節注射用液剤を調製した。

【0099】

【発明の効果】リウマチ症では、炎症性滑膜細胞の軟骨組織表層への浸潤、すなわちパンプスが重要な病態である。上述のように、本発明の脂質結合GAGが炎症性の軟骨表面や滑膜組織に固相化されることによって、伸展してくる炎症性滑膜細胞の関節軟骨組織への接着が阻害されることにより、パンプスが防止されることが、本発明の薬剤の作用機作として考えられる。従来このような作用機作に基づく抗リウマチ剤は知られておらず、本発明の薬剤は全く新しいタイプの抗リウマチ剤である。 *

*【0100】また、脂質結合GAGには、滑膜組織の炎症症状を改善する作用、すなわち滑膜細胞の異常増殖、フィブリン沈着、リンパ球の濾胞様集合の状態等を弱める作用もあることが見出され、上記パンプス抑制作用と相まって抗リウマチ剤としてより優れた効果が期待できる。

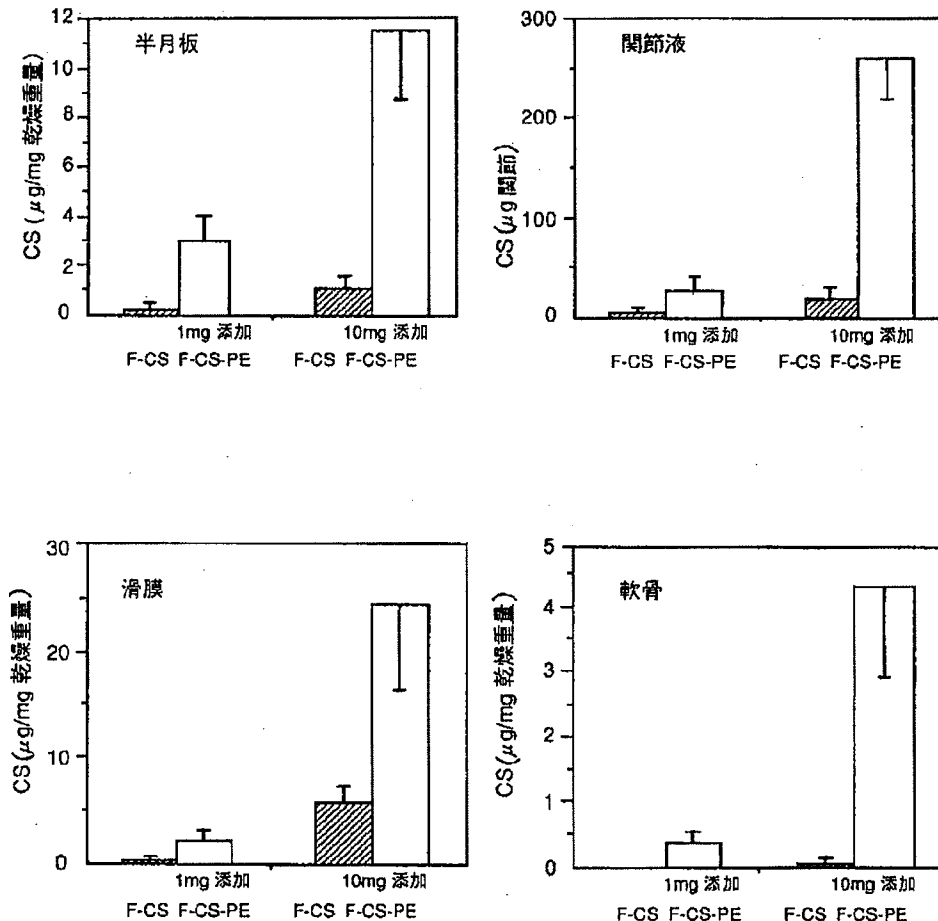
【0101】本発明薬剤の有効成分である脂質結合GAGは、元来毒性の極めて低い化合物であるが、炎症部位への局所投与で特に効果を発揮する本発明薬剤は、他の臓器への副作用はほとんどないものと思われる。

【図面の簡単な説明】

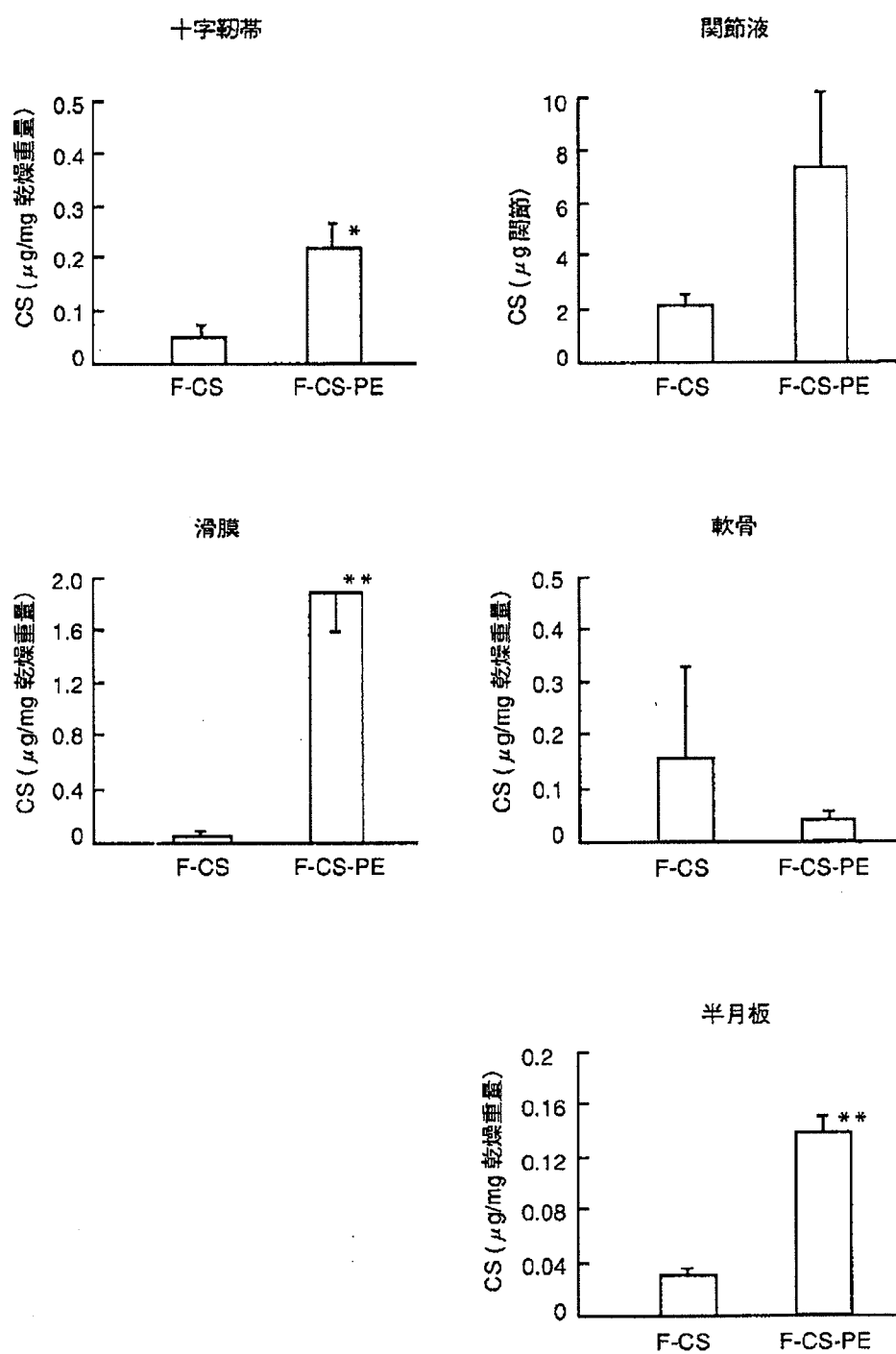
【図1】蛍光標識したコンドロイチン硫酸（F-CS）又は蛍光標識したCS-PE（F-CS-PE）を投与した、正常な日本白ウサギの各組織におけるF-CS又はF-CS-PEの残存量を示す。

【図2】蛍光標識したコンドロイチン硫酸（F-CS）又は蛍光標識したCS-PE（F-CS-PE）を投与した、大腸菌誘導関節炎日本白ウサギの各組織におけるF-CS又はF-CS-PEの残存量を示す。

【図2】



【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成5年10月25日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【従来の技術】慢性関節リウマチ（以下、RAという）は、関節炎を主病変とする慢性多発性炎症疾患であり、その血清及び関節液には、免疫グロブリンIgGと反応する自己抗体であるリウマトイド因子（以下、RFという）が検出される。RFの存在から、その病態には免疫異常が関与していると考えられているが、その病因は未だ不明である。RAの病態変化としては、便宜的におおよそ3期に分けて考えられている（Zvaifler NJ., Adv. Immunol., 16, 265-336, (1973)）。第1期は、未知の病原因子、すなわち抗原が関節滑膜に到達して滑膜炎が開始される初期相である。第2期では、滑膜炎を引き金として慢性炎症が大きく展開する。すなわち、滑膜表層下の微小血管新生、滑膜下組織の浮腫、滑膜表層細胞の増殖、肥厚および多層化などが現れ、小血管周囲ではリンパ濾胞様のリンパ球浸潤とその周辺の形質細胞浸潤がみられる。そして第3期では、炎症滑膜が細長い絨毛突起（パンヌス）となって関節腔内に突出し、軟骨破壊・骨破壊、そしてついに関節強直へと進行していく。この第3期の軟骨破壊・骨破壊は、臨床上著しい機能障害を残し、リウマチ患者の日常生活を著しく障害するので、初期の滑膜炎の防止と共に最も重要な時期である。軟骨破壊には、リウマチ関節液中に多量に放出されているプロテアーゼなどの消化酵素による、関節表面からのプロテオグリカンの直接分解作用と、滑膜組織のパンヌスによりその関節軟骨との接合部での細胞組織の破壊の機序があり、リウマチ患者の軟骨表層部ではプロテオグリカンの減少が見られる。リウマチ患者では特異的に、フィブロネクチン様物質を含んだ免疫複合体の関節軟骨表層への被覆がおこり、これが更にパンヌスを進行させているといわれている。特にフィブロネクチンは、活動性のリウマチ滑膜できわめて多量に産生されており、これは間葉系細胞の伸展因子であることから、パンヌスの伸展に積極的に関与していると考えられている（Shiozawa S., Scand. J. Rheu., Suppl. 74, 65-72, 1988）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】原料のGAGは、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的もしくは酵素的に合成されたものなどのいずれも使用する

ことができ、具体的にはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（A, B, C, D, E, K）、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸等が例示される。これらのGAGは通常使用される塩（例えばナトリウム塩）であってもよい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】原料の脂質は、動物、植物、微生物等の天然物由来又は化学的もしくは酵素的に合成もしくは部分的に分解された複合脂質又は単純脂質を使用することができ、特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジリンノシトール等のリン脂質；モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の中性脂質等のグリセロ脂質が好ましい。とりわけ、1級アミノ基を有するグリセロリン脂質が好ましい。なお、脂質中のアシル基の鎖長及び不飽和度は特に限定されないが、例えばパルミトイル（ヘキサデカノイル）又はステアロイル（オクタデカノイル）が例示される。また、これら脂質は通常使用される塩、例えば塩酸塩、酢酸塩等であってもよい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】GAGの還元末端の糖残基の還元は、GAGに対して5～50当量程度、好ましくは25～30当量の還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、ホウ酸塩緩衝液等）中、通常10～30℃、好ましくは15～25℃で1時間以上、より好ましくは3時間から18時間行うことができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】上記還元後、限定酸化を行ってGAGの還元末端に特異的にホルミル基を有するアルデヒド化合物を合成する。該酸化反応は、上記還元後のGAGに対して1～10当量、好ましくは3～6当量の酸化剤（過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム等の過ヨウ素酸

アルカリ塩など)を用い、通常0～10℃、好ましくは0～4℃で5分間以上、より好ましくは30分間から2時間行うことができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】得られたアルデヒド化合物と1級アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質など)とを反応させてシッフ塩基を形成させる反応は、水性溶媒(水、リン酸塩緩衝液等)又は適当な有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に、上記アルデヒド化合物を溶解した溶液と適当な有機溶媒(クロロホルム、メタノール等)に脂質を溶解した溶液とを混合し、通常15～60℃の温度で1時間以上、好ましくは5時間から18時間反応させることができる。この反応時又は反応終了後に適当な還元剤(水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など)を作用させてシッフ塩基を還元することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】GAGの還元末端の糖残基の酸化は、GAGに対して2～5.0当量程度、好ましくは5～15当量の酸化剤(ヨウ素、臭素等)を使用し、適当な水性溶媒(例えば、水、リン酸塩緩衝液等)中、通常0～60℃、好ましくは15～30℃で1時間以上、より好ましくは3時間から18時間行うことができる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】得られたラクトン化合物と1級アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質)との反応は、適当な水性溶媒(水、リン酸塩緩衝液等)又は適当な有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)にラクトン化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒(クロロホルム、メタノール等)に脂質を溶解した溶液とを混合し、5～80℃、好ましくは30～60℃の温度で10分以上、より好ましくは1時間から18時間反応させればよい。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】代表的化合物

本発明の有効成分である脂質結合GAGの好適な化合物を以下に例示する。

(1) ジパルミトイル-L- (α -ホスファチジル) エタノールアミン結合ヒアルロン酸(後述の参考例1のロット番号600の化合物)

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正内容】

【0038】原料

GAG: ヒアルロン酸(鶏冠由来、分子量 1万)

脂質: ジパルミトイル-L- (α -ホスファチジル) エタノールアミン

合成法

還元末端ラクトン化法[特開平4-80201号公報の実施例1-(2)-1)及び後述の参考例1参照]

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】(2) ジパルミトイル-L- (α -ホスファチジル) エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸(参考例1の表3ロット番号602-2の化合物)

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正内容】

【0041】原料

GAG: コンドロイチン硫酸(鮫軟骨由来、分子量 3万; 主にコンドロイチン硫酸Cを含む)

脂質: ジパルミトイル-L- (α -ホスファチジル) エタノールアミン

合成法

還元末端ラクトン化法[参考例1の表3及び特開平4-80201号公報の実施例1-(2)-2)参照]

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

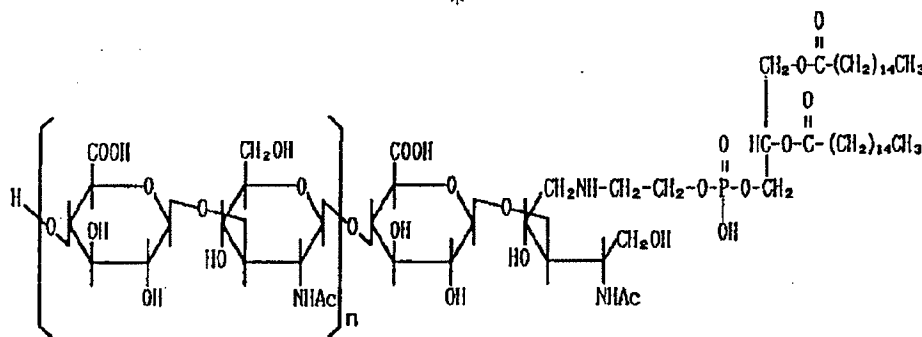
【0044】原料

GAG: コンドロイチン硫酸(鮫軟骨由来、分子量 3万; 主にコンドロイチン硫酸Cを含む)

脂質: ステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン

合成法

【化8】


$$\text{H} \left[\text{O} \left(\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right) \text{O} \left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{HO} \end{array} \right) \text{O} \left(\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right) \text{O} \left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-O-CH}_2 \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right) \text{O} \left(\begin{array}{c} \text{NHAc} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right) \right]_n$$

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】脂質結合GAGは、多くは水溶性であり、容易に液体製剤を調製することができる。特に、抗リウマチ剤としての効果を十分に発揮させるために、注射剤として関節腔内に投与することが好ましい。注射剤等の液体製剤を製造するには、脂質結合GAGを必要に応じてpH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなど）、等張化剤（塩化ナトリウム、ブドウ糖など）とともに注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンブルに充填するか、さらにマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチンなどを加えて真空中に凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤としてもよい。また、脂質結合GAGに、乳化剤（レシチン、ポリソルベート80（AtlasCo.製）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油など）を加えて水中で乳化させ、注射用乳剤とすることもできる。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】（2）ジパルミトイル-L-（ α -ホスファチジル）エタノールアミン結合GAGの合成
還元末端ラクトンヒアルロン酸トリ-n-ブチルアミン塩400mgをジメチルホルムアミド200mlに溶解し、これにジパルミトイル-L-（ α -ホスファチジル）エタノールアミン（以下、PEという）27.6mgを含むクロロホルム溶液を添加し、70℃で2時間反応させた。反応後、クロロホルムを溜去し、過剰量の酢酸ナトリウムを加え、次いで酢酸ナトリウム飽和エタノールを加え、生成した沈澱を濾取した。これを0.3M 酢酸アンモニウム溶液に溶解し、疎水クロマトカラム（TSK gel フェニルトヨパール650 M；東ソー（株）製）400mlに吸着させ、0.3M 塩化ナトリウム水溶液で十分に洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り画分及び洗浄画分に未反応の原料物質が溶出され、30%メタノール水溶液溶出画分に目的物が溶出された。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮

し、透析して脱塩し、凍結乾燥してPE結合ヒアルロン酸（ロット番号：600）36mgを得た。

ロット番号：600

PE含量：6.44%

ヒアルロン酸含量：82.37%

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正内容】

【0072】（2）ジパルミトイル-L-（ α -ホスファチジル）エタノールアミン結合GAGの合成
還元末端限定酸化ヒアルロン酸1000mgを0.05M リン酸緩衝液（pH7.0）100mlに溶解し、これにPE 1mg/mlを含むクロロホルム-メタノール（2：1）溶液69.2mlを加え、さらにメタノールを加えて均一な溶液とし、50℃で1時間反応させた。次いでシアノ素化ホウ素ナトリウム25mgを加え、50℃で2時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、5倍量の酢酸飽和エタノールを加え、生じた沈澱を濾取した。沈澱を0.3M 塩化ナトリウム溶液で溶解し、疎水クロマトカラム（TSK gel フェニルトヨパール650 M）400mlに吸着させ、0.3M 塩化ナトリウム水溶液で十分に洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り画分及び洗浄画分に未反応の原料物質が溶出され、30%メタノール水溶液溶出画分に目的物が溶出された。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、透析して脱塩し、凍結乾燥してPE結合ヒアルロン酸（ロット番号：300）40mgを得た。

ロット番号：300

PE含量：6.21%

ヒアルロン酸含量：62.12%

【手続補正22】

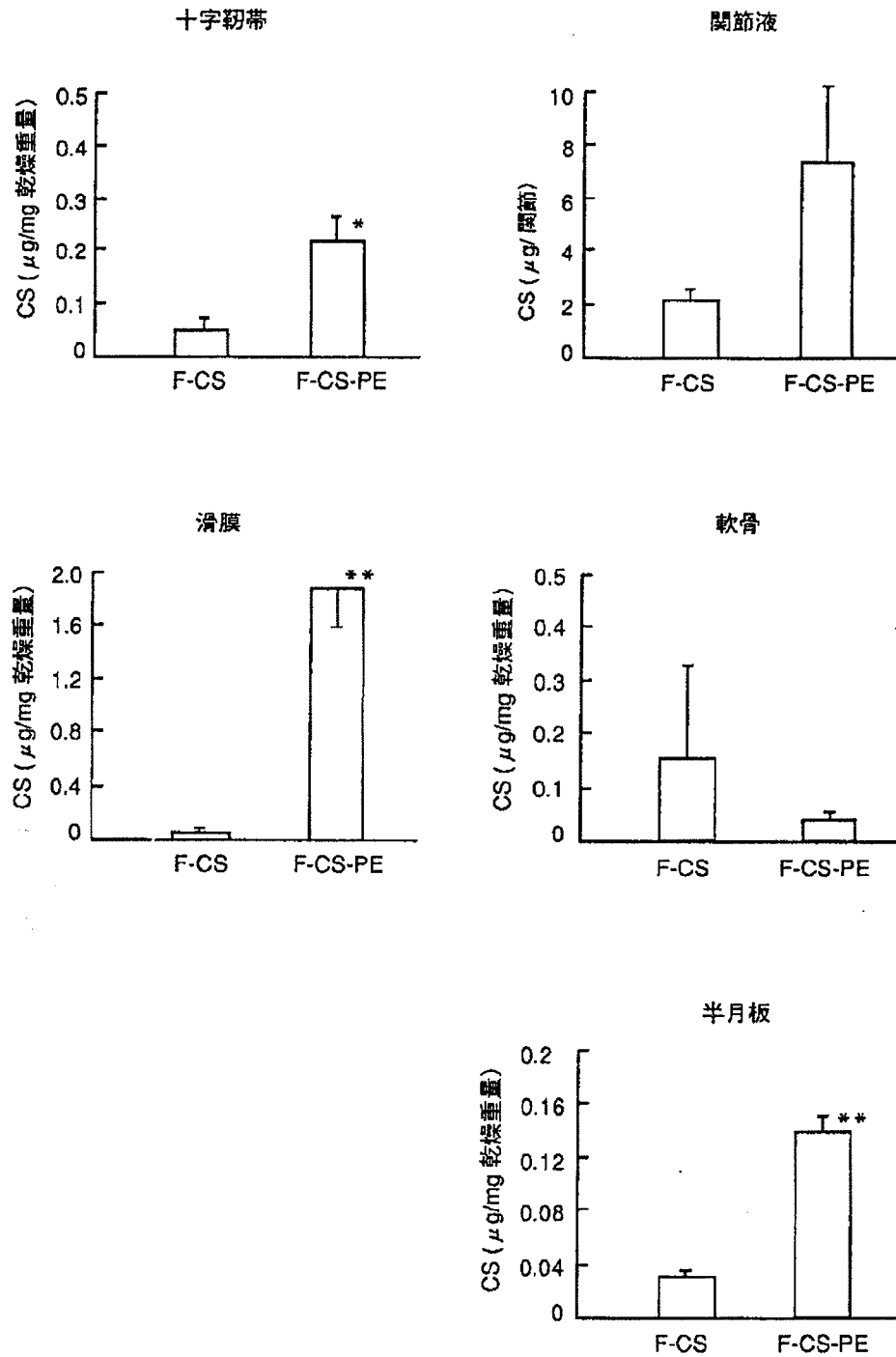
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



【手続補正23】

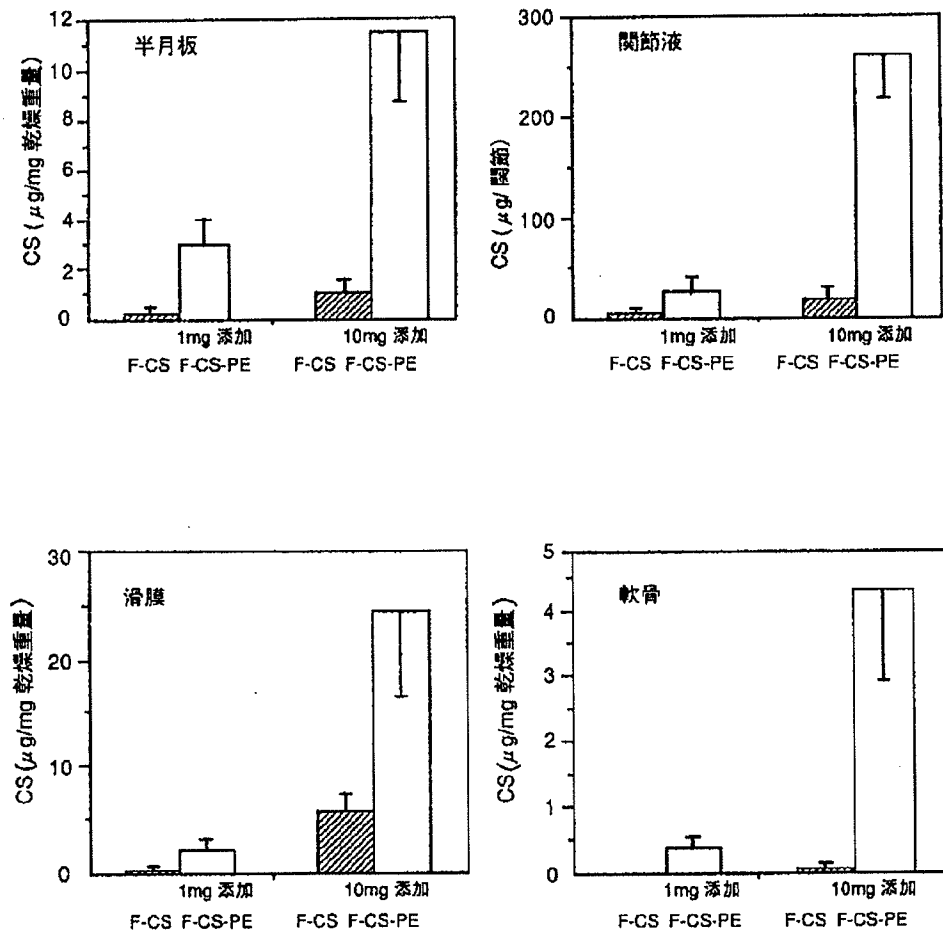
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 旺
愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21 愛知
医科大学分子医科学研究所内

(72)発明者 木全 弘治
愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21 愛知
医科大学分子医科学研究所内